

*Metodi molecolari per l'identificazione
di lieviti isolati dalle paste acide siciliane***

P. Giudici¹, A. Pulvirenti¹

¹ Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, Via Kennedy, 17 - 42100 Reggio Emilia

1. Introduzione

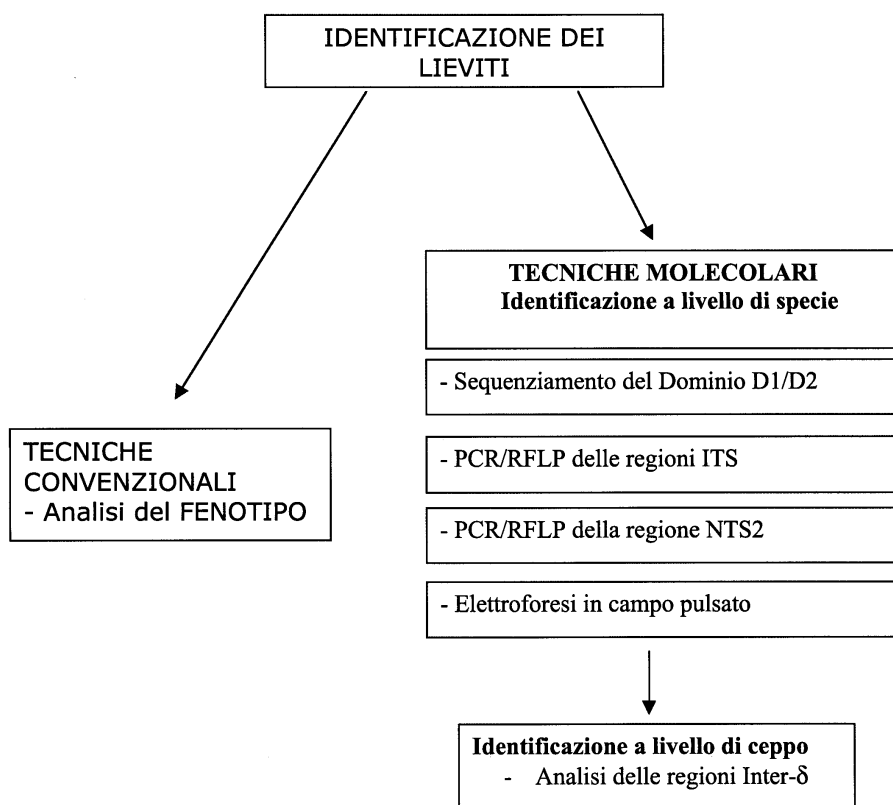
Le paste acide sono impasti fermentati grazie alla presenza di una ricca flora microbica costituita da batteri lattici e lieviti. Questi ultimi rivestono un ruolo molto importante, in quanto i prodotti primari del loro metabolismo energetico, anidride carbonica ed etanolo, determinano l'aumento di volume dell'impasto e la formazione della struttura porosa e alveolata della pasta, mentre alcuni prodotti secondari contribuiscono a determinare l'aroma tipico del pane. Le paste acide sono costituite da farina, acqua e "lievito naturale". Quest'ultimo è l'impasto della lavorazione precedente opportunamente rinnovato da impiegare come coltura starter. Originariamente il lievito naturale era ottenuto dall'acidificazione spontanea dell'impasto, dovuta alla contaminazione delle materie prime e dagli attrezzi utilizzati. Il tempo necessario alla maturazione degli impasti varia da qualche ora a tutta la notte precedente la lavorazione vera e propria. Invece con il termine "lievito madre" si intende la frazione di impasto conservata in forma disidratata o congelata da impiegare come inoculo per la produzione di lievito naturale.

In questo lavoro sono stati identificati, impiegando tecniche molecolari, i lieviti che caratterizzano gli impasti acidi siciliani. L'elettroforesi in campo pulsato (PFGE), la PCR/RFLP delle regioni NTS2 (Non-Transcribed spacer2) e ITS (Internal Transcribed Spacer) contenute nel DNA ribosomale (rDNA) ed ancora il parziale sequenziamento della subunità 26S del rDNA sono stati impiegati per l'identificazione dei ceppi in esame. I risultati, di seguito esposti, mostrano la presenza di ceppi di lievito appartenenti alle specie *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces anamensis*, *Issatchenkia orientalis*, *Candida milleri*.

2. Identificazione dei ceppi a livello di specie

Alcune regioni del DNA possono essere utilizzate per l'identificazione a livello di specie. Tali regioni devono soddisfare le seguenti caratteristiche specifiche: presentare quindi un alto polimorfismo interspecifico ed un basso o nullo polimorfismo intraspecifico (contenere siti caratteristici per le diverse specie e presentare un elevato grado di stabilità all'interno della stessa specie).

Le tecniche da noi discusse sono riportate nello schema che segue.



Sono stati isolati 48 ceppi da 13 campioni di pasta acida prelevati da diversi panifici artigianali ed identificati fenotipicamente con le chiavi di Barnett. Alcuni ceppi sono stati facilmente attribuiti alle specie di appartenenza, ma per altri questa procedura di identificazione non è stata sufficiente. Tutti i ceppi sono stati quindi sottoposti ad elettroforesi in campo pulsato per l'analisi dei cromosomi interi. Trentatré dei 48 ceppi isolati hanno mostrato cariotipo caratteristico della specie *Saccharomyces cerevisiae*, presentando da 14 a 16 bande comprese fra 2200 Kb e 225 Kb (figura 1). Le condizioni elettroforetiche applicate non hanno permesso una buona separazione dei ceppi non appartenenti al genere *Saccharomyces*, caratterizzati dalla presenza di cromosomi ad alto peso molecolare (esempi sono riportati nella figura 1).

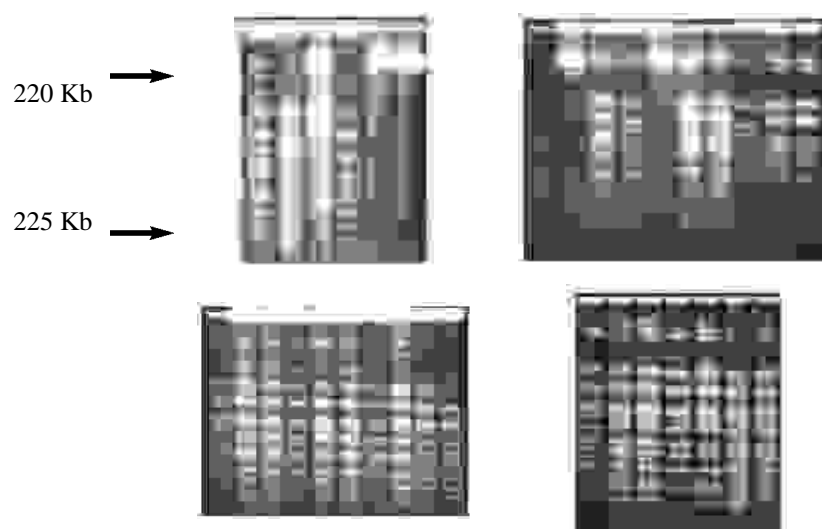


Fig. 1 - Cariotipo elettroforetico di un campione rappresentativo dei ceppi testati.

Un campione rappresentativo di questi è stato sottoposto a prove PFGE con programmi specifici (figura 2) e comparato con ceppi standard.

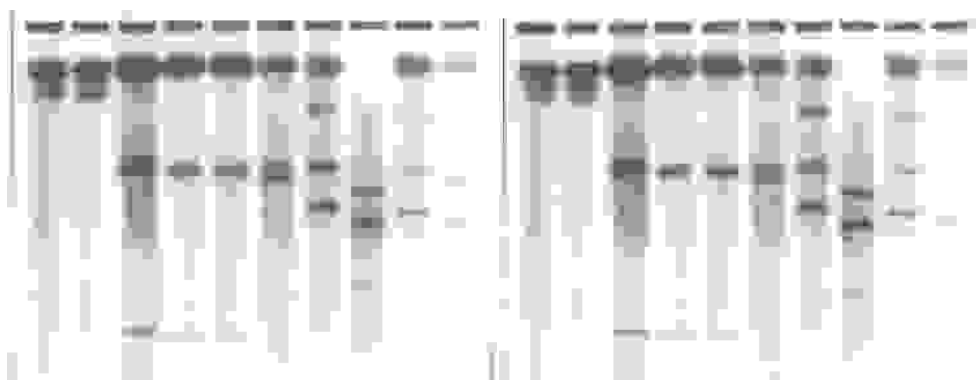
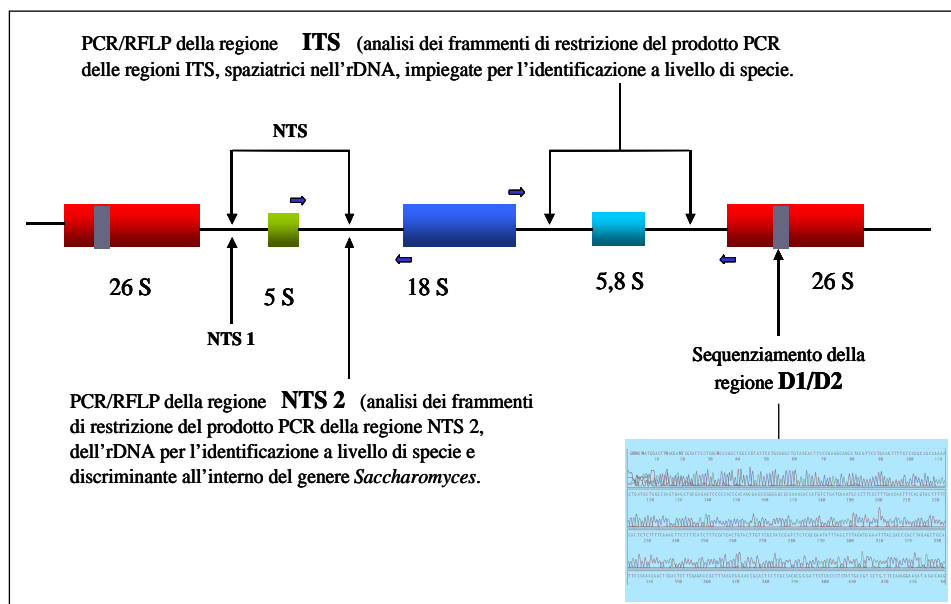


Fig. 2 - Cariotipo elettroforetico dei ceppi non appartenenti al genere *Saccharomyces*.

Sono state prese in esame alcune regioni presenti nei domini del DNA ribosomale, sotto descritti.



Tutti i 48 ceppi sono stati sottoposti all'amplificazione della regione NTS2 (di non trascrizione) del rDNA. Solo i 33 ceppi sicuramente appartenenti al genere *Saccharomyces* hanno dato prodotto di amplificazione. L'amplificato è stato tagliato con gli enzimi di restrizione *Alu I* e *Ban I* ed i frammenti sono stati confrontati con i ceppi tipo di *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1171 e *Saccharomyces anamensis* CBS 1200 (figure 3, 4, e 5). L'RFLP (analisi dei frammenti di restrizione) con *Alu I* non è stata in grado di discriminare tra *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces anamensis*. Con il primo enzima, *Alu I*, tutti i ceppi hanno mostrato medesimo profilo, evidenziato in figura 3,

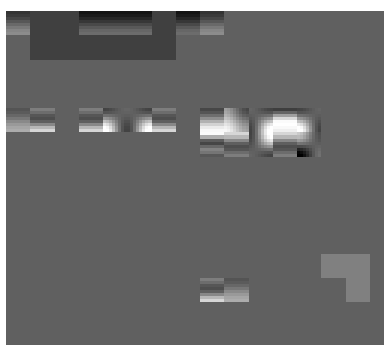


Fig. 3 - Restrizione con l'enzima *Alu I*
S. cerevisiae = 1122 + 175 pb



Fig. 4 - Restrizione con l'enzima *Ban I*
S. cerevisiae = 668 + 404 + 225 pb

mentre gli stessi, tagliati con l'enzima *Ban I*, hanno mostrato un polimorfismo. Venti ceppi presentavano tre bande (due siti di taglio), così come il ceppo tipo di *Saccharomyces cerevisiae* (figura 4), mentre gli altri 13 solo due bande (un sito di taglio), come il ceppo tipo di *Saccharomyces anamensis* (figura 5).



Fig. 5 - Restrizione con l'enzima *Ban I*
S. cerevisiae = 668 + 404 + 225 pb
S. cerevisiae old type *anamensis* = 1080 + 225 pb

Per verificare il livello di polimorfismo dei 33 ceppi appartenenti alle specie *S. cerevisiae* e *S. anamensis*, abbiamo analizzato il prodotto di amplificazione delle regioni inter-d. Lo studio di tali regioni è in grado di discriminare gli isolati a livello di ceppo. Il polimorfismo mostrato è stato alto, presentando 11 profili differenti, come mostrato in figura 6. Profili differenti identificano sicuramente ceppi diversi, ma in contrasto con quanto riportato in letteratura, la presenza di un profilo identico non dimostra con certezza la presenza dello stesso ceppo. Infatti il ceppo YP1, identificato come *S. anamensis* mediante l'RFLP della regione NTS2, mostra un identico profilo inter-d con altri ceppi della specie *S. cerevisiae*.



Fig. 6 - Analisi delle regioni inter -

L'identificazione dei 15 ceppi non appartenenti al genere *Saccharomyces* è proseguita con il sequenziamento della regione D1/D2 contenuta nel gene 26S dell'rDNA e costituita da 600 pb. L'analisi di questa regione, così come proposto nel 1998 da Kurtzman e Robnett, è un metodo utile per identificare i lieviti e risolvere le relazioni filogenetiche fra gli stessi. L'analisi della divergenza della sequenza nucleotidica di questa regione è sufficiente per la risoluzione di circa 500 specie di lieviti ascomiceti. Applicando questa tecnica ai nostri isolati, i 33 ceppi già identificati come *S. cerevisiae* e *S. anamensis* hanno mostrato il 100% di similarità con le sequenze presenti in GeneBank di *S. cerevisiae* ceppo tipo, altri 8 ceppi hanno presentato il 100% di similarità con la sequenza del ceppo tipo di *Issatchenkia orientalis* e gli ultimi 7 con la sequenza di *Candida milleri*.

Per confermare i dati ottenuti con la comparazione della sequenza D1/D2 abbiamo effettuato la PCR/RFLP sulle sequenze spaziatrici interne (ITS) dell'rDNA, con quattro enzimi di restrizione, eseguendole parallelamente sui ceppi tipo di *Issatchenkia orientalis* e *Candida milleri*. I risultati hanno confermato la presenza nei nostri isolati di 8 ceppi appartenenti alla specie *I. orientalis* (figure 7 A) e 7 a *C. milleri* (figure 7 B).



Fig. 7 - Restrizioni delle regioni ITS

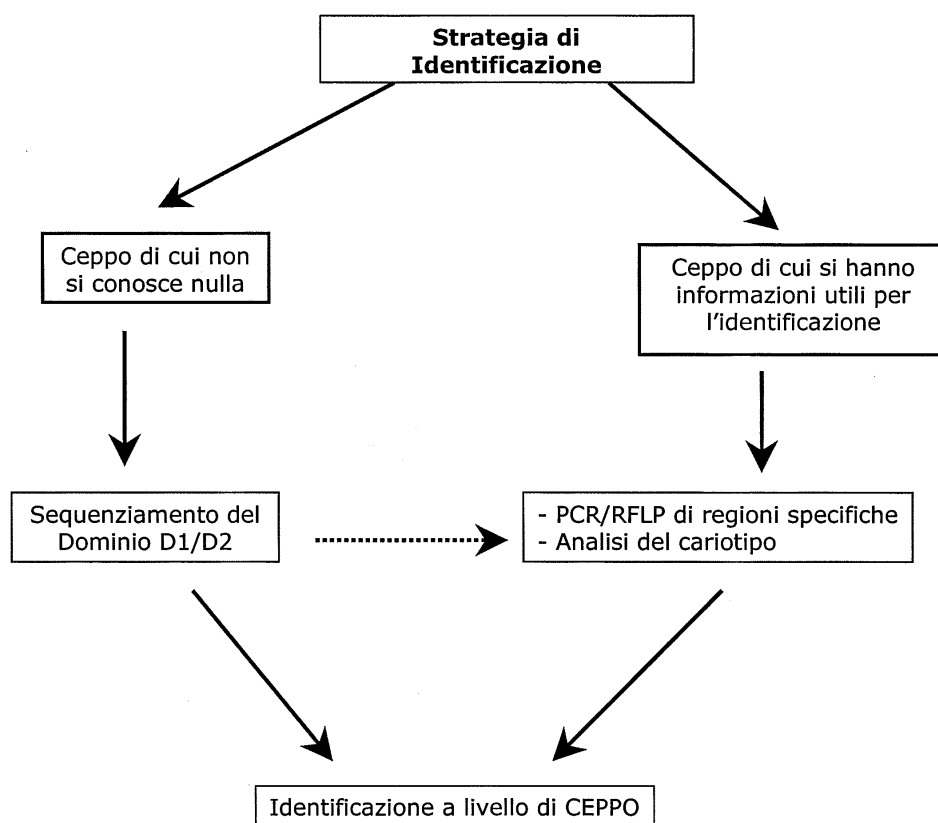
Strategia di identificazione

L'identificazione di un ceppo ignoto può essere fatta seguendo due vie, una riservata a quei ceppi di cui non si conosce nulla tranne il luogo e la matrice di isolamento; la seconda viene riservata a quelli di cui si dispongono già altre informazioni che consentono di ipotizzare l'appartenenza ad un genere quali: modalità di riproduzione sessuale, morfologia cellulare ed altro. Nel primo caso è vantaggioso applicare lo studio delle sequenze del dominio D1/D2 da comparare con i database proposti in letteratura. Queste consentono di attribuire i ceppi in esame alla specie di appartenenza o, in rarissimi casi, di restringerne il campo di ricerca a pochissime specie filogeneticamente molto vicine.

I risultati possono essere confermati con la PCR/RFLP delle regioni NTS2 e/o ITS e la comparazione dei frammenti riscontrati è risolutiva per l'identificazione certa dei ceppi in esame.

Per stabilire se più ceppi isolati appartenenti tutti alla stessa specie siano in realtà più di uno o semplicemente lo stesso isolato più volte, è necessario operare applicando l'analisi delle regioni inter- , che solo in rarissime eccezioni danno profili identici per ceppi diversi. Normalmente ogni ceppo ha un proprio fingerprinting relativamente ai frammenti delle regioni inter- . I pochi casi controversi possono essere risolti mediante l'applicazione dell'RFLP del DNA mitocondriale, metodo sicuro per la discriminazione dei ceppi, ma che risulta sicuramente più complesso rispetto all'analisi delle regioni inter- .

Nel caso invece si abbiano già delle indicazioni sul genere di appartenenza le strategie da impiegare sono diverse in funzione del genere stesso. Ad esempio se si presume l'appartenenza al *gruppo S. sensu stricto* la sola PCR/RFLP della regione NTS2 è sufficiente per una corretta attribuzione a livello di specie. Per altri generi lo studio della dimensione dell'amplificato delle regioni ITS può essere sufficiente per una prima attribuzione del genere di appartenenza. Le successive restrizioni e le comparazione degli RFLP consente nella maggior parte dei casi l'attribuzione degli isolati alla specie di appartenenza. Una rapida distinzione tra le specie *S. cerevisiae* e *S. uvarum* può essere ottenuta con l'analisi del cariotipo mediante elettroforesi in campo pulsato.



Bibliografia

- Barnett J. A. (1992), *The taxonomy of the genus Saccharomyces. Meyen ex Reess: a short review for a non-taxonomist*, Yeast, 8, 1-23.
- Esteve-Zarzoso B., Belloch C., Uruburu F. e Querol A. (1999), *Identification of yeast by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal Internal Transcribed Spacers*, Inter. J. Syst. Bact. 49, 329-337.
- Giudici P., Caggia C., Pulvirenti A. e Rainieri S. (1998), *Karyotyping of Saccharomyces strains with different temperature profiles*, J. Appl. Microbiol. 84, 811-819.
- Gobbetti M., Corsetti A., Rossi J. e De Vincenzi S. (1995), *The sourdough microflora. Characterisation of homofermentative lactic acid bacteria based on acidification kinetics and impedance test*, Ital. J. Food. Sci. 2:91-101.
- Iorizzo M., Coppola R., Sorrentino E. e Grazia L. (1995), *Caratterizzazione microbiologica di paste acide molisane*. Ind. Alim. 4: 1290-1294.
- Kurtzman C. P. e Robnett C. J. (1998), *Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) rDNA partial sequences*, Antonie van Leeuwenhoek 73, 331-371.
- Molina F. I., Inoue T. e Jong S. C. (1992), *Restriction Polymorphisms in the Internal Transcribed Spacers and 5.8S rDNA of Saccharomyces*, Current Microbiology, vol. 25:251-255.
- Ness F., Lavallée F., Dubourdiou D., Aigle M. e Dulau L. (1993), *Identification of yeast strains using the Polymerase Chain Reaction*, J. of Sci Food Agric. 62, 89-94.
- Nguyen H. V. e Gaillardin C. (1997), *Two subgroup within the Saccharomyces bayanus species evidenced by PCR amplification and restriction polymorphism of the Non-Transcribed Spacer 2 in the ribosomal DNA Unit*. Appl. Microbiol. 20, 268-294.
- Nguyen H. V., Lepingle A. e Gaillardin C. (2000), *Molecular typing demonstrates homogeneity of Saccharomyces uvarum strains and reveals the existence of hybrids between S. uvarum and S. cerevisiae, including the S. bayanus type strains CBS 380*. System. Appl. Microbiol. 23, 71-85.
- Nguyen H. V., Pulvirenti A. e Gaillardin C. (2000), *Rapid differentiation of the closely related Kluyveromyces lactis var. Lactis and Kluyveromyces marxianus strains isolated from dairy products using selective medium and PCR/RFLP of the rDNA non transcribed spacer 2*. Canad J. Microb., 46, 1115-1122.

- Pulvirenti A., Caggia C., Restuccia C., Giudici P. e Zambonelli C. (2000), *Inheritance of mitochondrial DNA in interspecific Saccharomyces hybrids*, Ann. Of Microb. 50, 61-64.
- Pulvirenti A., Caggia C., Restuccia C., Gullo M. e Giudici P. (2001), *DNA fingerprinting methods used for identification of yeasts isolated from sicilian sourdoughs*, Ann. Of Microb. 51, 107-120.
- Rainieri S., Zambonelli C., Hallsworth J. E., Pulvirenti A. e Giudici P. (1999), *Saccharomyces uvarum: a distinct group within Saccharomyces*. FEMS Microbiol. Lett. 177, 177-185.
- Rossi J. (1996), *The yeasts in sourdough*, Adv. Food Sci. 18: 201-21.